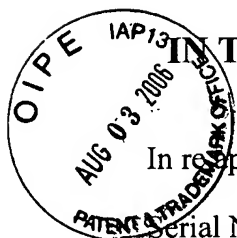


IDW



IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

In re application of Jian ZHAO et al.

Serial No.: 10/601,314

Examiner: Bernard I. Dentz

Confirmation No.: 6959

Art Unit: 1614

Filed: June 20, 2003

For: **METHODS OF MAKING AND USING THEAFLAVIN, THEAFLAVIN-3-GALLATE, THEAFLAVIN-3'-GALLATE AND THEAFLAVIN 3,3'-DIGALLATE AND MIXTURES THEREOF**

U.S. Patent and Trademark Office
Customer Service Window
Randolph Building
401 Dulany Street
Alexandria, VA 22314

TRANSMITTAL OF DOCUMENTS

Enclosed are the following for the above-identified application:

- ☒ Submission of Priority Document; and
- ☒ Certified Copy of Chinese Application No. 02111512.5 filed April 26, 2002; and

The Director is hereby authorized to charge any appropriate fees under 37 C.F.R. §§1.16, 1.17, and 1.21 that may be required by this paper, and to credit any overpayment, to Deposit Account No. 50-1283.

Dated:

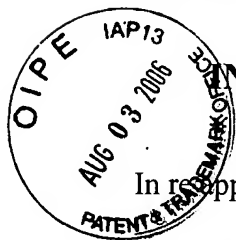
August 3, 2006

COOLEY GODWARD LLP
ATTN: Patent Group
The Bowen Building
875 15th Street NW, Suite 800
Washington, DC 20005-2221
Tel: (202) 842-7800
Fax: (202) 842-7899

Respectfully submitted,
COOLEY GODWARD LLP

By:

Jayne A. Huleatt
Jayne A. Huleatt
Reg. No. 34,485



IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

In re application of Jian ZHAO et al.

Serial No.: 10/601,314

Examiner: Bernard I. Dentz

Confirmation No.: 6959

Art Unit: 1614

Filed: June 20, 2003

For: **METHODS OF MAKING AND USING THEAFLAVIN, THEAFLAVIN-3-GALLATE, THEAFLAVIN-3'-GALLATE AND THEAFLAVIN 3,3'-DIGALLATE AND MIXTURES THEREOF**

U.S. Patent and Trademark Office
Customer Service Window
Randolph Building
401 Dulany Street
Alexandria, VA 22314

SUBMISSION OF PRIORITY DOCUMENT

The benefit of the filing date of April 26, 2002 for Patent Application No. CN 02111512.5, has been previously claimed in the above-identified application. Applicants note that the Chinese Patent Applications were referenced in the specification as originally filed and in the executed declaration previously submitted.

Applicants submit herewith a certified copies of Chinese Application No. 02111512.5.

Dated:

August 3, 2006

COOLEY GODWARD LLP
ATTN: Patent Group
The Bowen Building
875 15th Street NW, Suite 800
Washington, DC 20005-2221
Tel: (202) 842-7800
Fax: (202) 842-7899

Respectfully submitted,
COOLEY GODWARD LLP

By:

Jayne A. Huleatt
Jayne A. Huleatt
Reg. No. 34,485

证 明

本证明之附件是向本局提交的下列专利申请副本

申 请 日 期: 2002. 04. 26

申 请 号 码: 02111512. 5

申 请 类 别: 发明

发 明 创 造 者 姓 名: 茶黄素的新用途

申 请 人 名 称: 上海科宝生物技术有限公司

发 明 人 姓 名: 赵剑、周睿、陈虎



CERTIFIED COPY OF
PRIORITY DOCUMENT

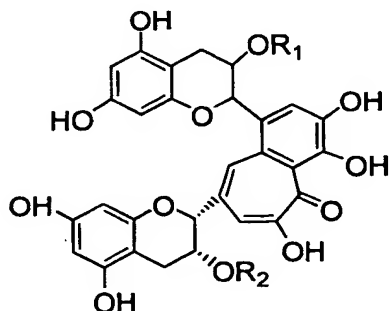
中华人民共和国
国家知识产权局局长

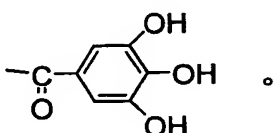
王 景 川

2004 年 8 月 6 日

权利要求书

1. 一种结构式如下的茶黄素在制备预防或治疗高血脂症的保健品或药品中的应用,



其中: R_1 为 H 或 G; R_2 为 H 或 G; G 为 .

2. 根据权利要求 1 所述的应用, 其特征在于 $R_1=H$, $R_2=H$ 。
3. 根据权利要求 1 所述的应用, 其特征在于 $R_1=G$, $R_2=H$ 。
4. 根据权利要求 1 所述的应用, 其特征在于 $R_1=H$, $R_2=G$ 。
5. 根据权利要求 1 所述的应用, 其特征在于 $R_1=G$, $R_2=G$ 。
6. 根据权利要求 1 所述的应用, 其特征在于该茶黄素为权利要求 2 或 3 或 4 或 5 中所述单体的任意组合。

说明书

茶黄素的新用途

技术领域

本发明涉及一种茶黄素的新的药物用途，特别涉及其在制备预防或治疗高血脂症的保健品或药品中的应用。

发明背景

高脂血症是指血清中总胆固醇、甘油三脂、低密度脂蛋白-胆固醇水平单项或多项超过正常值范围，是心血管类疾病的首要的病因，是当今社会的常见病。高脂血症易产生动脉粥样硬化，其结果是导致高血压、冠心病、中风、肾衰等临床疾病。高脂血症的发生与饮食、遗传、环境、生活方式密切相关，有效降低血清总胆固醇、甘油三脂、低密度脂蛋白-胆固醇水平可显著降低冠心病的发生率和死亡率。目前临床上化学类降脂药主要有他汀、贝特、树脂、丙丁酚等几大类，它们均存在一定的缺陷，特别是安全性差，2001年西立伐他汀因使用者发生横纹肌溶解致死而撤下市场，其它一些他汀类药物也存在同样的问题；市场上使用的天然调脂药品大部分有效成分复杂而未知，保健品中大部分降脂产品的疗效没有经过科学而严格的临床试验如进行双盲、安慰剂平行对照的科学试验证实。因此人们一直有兴趣寻找一种安全而有效的调脂新药。

茶叶是用 *Camellia sinensis* 的叶子干制而成，是人们的常见饮品，每年有 30 亿吨的茶叶被人们生产和消耗掉。国际上有关茶叶与健康的研究很多，主要集中在肿瘤和心血管方面，有报道茶叶具有降血脂的作用，受试产品是绿茶、红茶、乌龙茶或茶多酚，如 1986 年日本 keiichiro 等报道了茶叶中儿茶素对高胆固醇饲养的 SD 大鼠具有降血脂的功能，市场上已有茶多酚的降脂产品，如“心脑血管健”，但因茶多酚的降脂效果不明显，需添加其它中药成

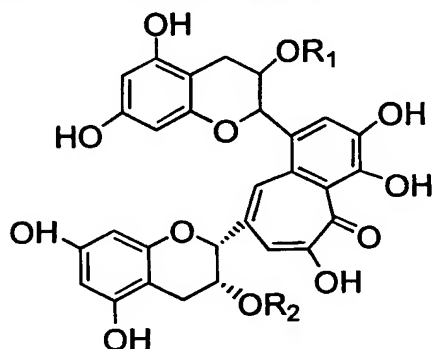
分增强其疗效。

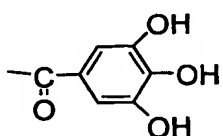
有关茶叶提取物的研究主要集中在茶多酚上，茶黄素单体的研究相比较少，有报导茶黄素单体具有抗氧化和抗肿瘤作用，未见其作为降血脂的用途报道，孙刘根申请的有关茶色素的生产方法及药物用途的中国专利和 WO 专利 (CN 93110413, WO 9908674 等) 所保护的茶色素为茶褐素、茶红素和茶黄素的混合物，其茶黄素的含量仅为 1-3%，其它主要是茶褐素和茶红素，但它们均为高聚物，化学结构未知，尚不能对茶褐素和茶红素精确定量，江西绿色工业集团根据此专利生产的茶色素胶囊也已在市场上销售，提到此混合物具有降血脂的功效，但还不清楚茶色素中明确具有降血脂的成分，而且服用剂量大，一日为 375mg~1125mg。

发明内容

本发明提供了一种茶黄素在制备预防或治疗高血脂症的保健品或药品中的应用。通过动物实验发现，本发明提供的茶黄素的调脂作用，特别是其降低血清总胆固醇、低密度脂蛋白和甘油三脂水平的作用，较其它茶提物如儿茶素的作用强。通过严格规范的双盲、安慰剂平行对照、多中心临床试验，也证实了本发明提供的茶黄素产品对高血脂病人的降脂作用，并且具有高度的耐受性和安全性。

本发明提供的茶黄素的通式如下：



其中：R₁ 为 H 或 G；R₂ 为 H 或 G；G 为 

茶黄素 (theaflavins, TFs) 的特征是：含有茶黄素 (Theaflavin, TF1,

当 R_1 为 H, R_2 为 H 时), 茶黄素-3-单没食子酸脂 (theaflavin-3-gallate, TF2A, 当 R_1 为 G, R_2 为 H 时), 茶黄素-3'-单没食子酸脂 (theaflavin-3'-gallate, TF2B 当 R_1 为 H, R_2 为 G 时), 茶黄素-3,3'-双没食子酸脂 (theaflavin-3,3'-digallate, TF3, 当 R_1 为 G, R_2 为 G 时) 四个单体中的一种或它们的任意组合, 它们可表现出降血脂的活性, 可以用于治疗高脂血症。

具体实施方式

本发明所指的茶黄素是由成对的儿茶素氧化聚合而成, 存在二羟基苯骈酚酮结构 (1',2'-二羟基-3,4-苯骈卓酚酮), 尤其指茶黄素 (Theaflavin,TF1), 茶黄素-3-单没食子酸脂 (theaflavin-3-gallate,TF2A), 茶黄素-3'-单没食子酸脂 (theaflavin-3'-gallate,TF2B), 茶黄素-3,3'-双没食子酸脂 (theaflavin-3,3'-digallate,TF3) 四个单体中的一种或它们的任意组合, 其水溶液色橙黄, 提纯结晶后为色泽金黄的结晶状粉末, 在水中重结晶得橙黄色针状晶体, 熔点 237~240℃ (分解), 易溶于热水、乙酸乙脂、正丁醇、异丁基甲酮、甲醇等, 溶液显很弱的酸性, 在碱性溶液中有自动氧化的倾向, 并随 PH 值的增加而加强。

茶黄素在红茶中的含量最高, 是红茶茶汤的主要黄色色素, 是衡量红茶品质的主要指标, 红茶的茶黄素的含量一般为 0.3%~1.5%, 高的可达 1.7% 以上, 但从红茶直接提取茶黄素的方法得率低, 成本高, 不适于工业化大批量生产, 本发明提供了茶黄素工业化生产方法, 其特征在于:

发酵: 利用多酚氧化酶的酶促反应, 并模拟红茶的发酵工艺将作为反应底物的游离的儿茶素单体或鲜绿茶叶中的儿茶素氧化催化为茶黄素;

粗纯化: 通过离心和过滤将发酵液固液分离, 液相用有机溶剂萃取, 并用碱洗 1~3 次, 有机相通过减压浓缩至干浸膏备用;

纯化: 将步骤 2 得到的干浸膏用硅胶柱分离, 用不同浓度的乙酸乙脂溶液进行洗脱, 收集目标峰经浓缩干燥后即可得目标产物。

本发明利用了生物酶将反应底物氧化催化, 将儿茶素聚合为茶黄素, 通

过分离、纯化得到茶黄素单体。药理试验证实茶黄素对哺乳动物有降血脂的活性。降血脂的活性是指哺乳动物使用茶黄素后血脂水平下降, 并且血脂下降水平与茶黄素给与的量成一定的量效关系。

按照本发明，在应用此化合物或活性成分时，可通过任何一种的给药剂型给予哺乳动物作为预防和/或治疗高脂血症用，在制备成制剂过程中，将茶黄素作为主要活性成分，可加入赋形剂、防腐剂、粘合剂、矫味剂、崩结剂、润滑剂、溶剂、增稠剂、稳定剂等敷料混合，制成一种适于临床使用的剂型，如制成口服、注射等剂型（其中口服软胶囊为首选），用于药品、保健药品、保健食品和食品添加剂等领域。按照本发明还可将茶黄素与其它降血脂药联合使用或制备成复方制剂。茶黄素的给药剂量必须根据给药途径确定，一般成人（以 70kg 计）的每天给药剂量为 50~500mg（通常在 50~200mg 之间）。

本发明制备的茶黄素的药品、保健药品、保健食品和食品副作用远小于西立伐他汀等化学药物，可长期使用，作为预防和/或治疗高脂血症与其相关的其它心血管疾病，如动脉粥样硬化、冠心病等。

下面的例子作为例举而不是为了限制。

实施例 1

取茶多酚 100 公斤（含儿茶素 98.6%，EGCG45.2%）投入多功能提取罐中，加入 1000 升 PH6.4 的磷酸盐缓冲液，加入 10 公斤的多酚氧化酶（发明人自己制备，从苹果中提取），加热到 35.2℃，通氧，以 10rpm 速度搅拌，发应 40 分钟后，通入饱和水蒸气终止反应，将发酵液放入离心机离心，将上清液板材过滤，滤液以一比一的体积加入乙酸乙酯，充分搅拌，然后离心取上清液酯层，用等体积 5.0%Na₂CO₃ 溶液洗脱三次，离心取酯层减压回收乙酸乙酯并浓缩至浸膏，取浸膏适量用硅胶柱分离，用 40%的乙酸乙酯溶液洗脱，收集不同时间的峰浓缩后用无水乙醇多次重结晶，即可得到茶黄素、茶黄素-3-单没食子酸脂、茶黄素-3'-单没食子酸脂、茶黄素-3,3'-双没食子酸脂单体，纯度分别为 99.1%、98.7%、97.8%，99.3%，并经 HPLC-MS 连

用确证其具体结构。

实施例 2

取新鲜绿茶 100 公斤捣碎后投入多功能提取罐中，加入 1000 升 PH6.4 的磷酸盐缓冲液，加热到 30℃，通氧，以 10rpm 速度搅拌，发应 60 分钟后，通入饱和水蒸气终止反应，将发酵液放入离心机离心，将上清液板材过滤，滤液以一比一的体积加入乙酸乙酯，充分搅拌，然后离心取上清液酯层，用等体积 5.0%Na₂CO₃ 溶液洗脱三次，离心取酯层减压回收乙酸乙酯并浓缩至浸膏，取浸膏适量用硅胶柱分离，用 40%的乙酸乙酯溶液洗脱，收集某一时段的峰浓缩后真空干燥后，即可得到 99.3%茶黄素，含茶黄素 46.8%、茶黄素-3-单没食子酸脂 18.5%、茶黄素-3'-单没子酸脂 13.7%、茶黄素-3,3'-双没食子酸脂 20.3%。

实施例 3 茶黄素软胶囊的制备：

取 2kg 蜂蜡加入到油温 80℃的橄榄油 500kg 中，搅拌均匀后，冷至 40℃，将 100kg 的 99.3%茶黄素混悬其中，搅拌均匀，使用加入钛粉的囊材，经挤压机制备软胶囊，每粒内容物装量 700mg，含茶黄素 75mg。

实施例 4

本发明茶黄素对大鼠血清总胆固醇（TC）、低密度脂蛋白（LDL-C）、甘油三脂（TG）和高密度脂蛋白（HDL-C）的影响。

将雄性 SD 大鼠 90 只，体重为 100-130 克，分笼饲养于恒温室内，房间的温度为 22--24℃。同时，把 90 只大鼠随机分成 9 组，每组 10 只，分别喂给不同的饲料和固定量的水，其中 TF1-1，TF1-2，TF1-3 组分别给予茶黄素 TF1 纯品 1mg/kg/d、2mg/kg/d、4mg/kg/d，TF2A-2，TF2B-2 和 TF3-2 组分别给予茶黄素纯品 TF2A、TF2B 和 TF3 各 2mg/kg/d。CA-1 和 CA-2 组分别给予儿茶素 1mg/kg/d、2mg/kg/d，饲料配方见表 1。

表 1 实验用大鼠饮食配方

成 分		组 别								
		Control	TF1-1	TF1-2	TF1-3	TF2A-2	TF2B-2	TF3-2	CA-1	CA-2
基础饲料	酪蛋白	20%	20%	20%	20%	20%	20%	20%	20%	20%
	淀粉	47.5%	47%	46%	45%	46%	46%	46%	46%	46%
	矿物质	4.5%	4.5%	4.5%	4.5%	4.5%	4.5%	4.5%	4.5%	4.5%
	维生素	1.5%	1.5%	1.5%	1.5%	1.5%	1.5%	1.5%	1.5%	1.5%
	葡萄糖	20%	20%	20%	20%	20%	20%	20%	20%	20%
猪油		5%	5%	5%	5%	5%	5%	5%	5%	5%
胆固醇		1.0%	1.0%	1.0%	1.0%	1.0%	1.0%	1.0%	1.0%	1.0%
茶黄素 mg/kg/d	TF1	---	1	2	3	---	---	---	---	---
	TF2A	---	---	---	---	2	---	---	---	---
	TF2B	---	---	---	---	---	2	---	---	---
	TF3	---	---	---	---	---	---	2	---	---
儿茶素 mg/kg/d		---	---	---	---	---	---	---	1	2

将上述饲料连续喂养大鼠 8 周，末次给药前禁食 12 小时，给药后 1 小时采血测定各项血脂。结果见表 2

表 2 本发明茶黄素纯品对大鼠血脂 (mg/dL) 的影响 ($\bar{X} \pm SD$)

					组 别					
	Control	TF1-1	TF1-2	TF1-3	TF2A-2	TF2B-2	TF3-2	CA-1	CA-2	
TG	120.2±14.4	108.1±13.8 ²	97.4±11.6 ¹	87.7±12.2 ¹	95.7±10.5 ¹	96.2±10.2 ¹	95.36±9.2 ¹	113.9±12.0 ³	106.7±10.5 ²	
TC	131.3±10.0	116.3±8.2 ¹	101.3±7.9 ¹	90.8±7.1 ¹	97.3±8.4 ¹	97.8±8.5 ¹	95.5±7.4 ¹	123.1±8.1 ³	113.2±11.1 ³	
LDL	54.9±3.4	45.6±3.1 ¹	34.6±3.7 ¹	25.3±2.2 ¹	32.2±3.7 ¹	32.4±3.3 ¹	31.2±4.1 ¹	49.5±3.3 ³	44.1±2.4 ³	
HDL	48.3±1.7	48.8±1.7 ³	49.2±2.1 ³	49.4±1.9 ³	49.2±1.9 ³	49.3±2.7 ³	49.3±1.9 ³	48.2±2.2 ³	48.4±1.9 ³	

¹P<0.01, 与 control 组比较

² P<0.05, 与 control 组比较

³ 与 control 组比较无显著性差异

结果显示，与空白对照组比较，本发明茶黄素纯品对吃高脂饲料的大鼠血清总胆固醇、低密度脂蛋白和甘油三酯水平有明显下降，并且下降幅度大于服用儿茶素产品的大鼠。同时发现，本发明茶黄素纯品的服用剂量与血脂的下降呈现量效关系。

实施例 5

通过临床研究，评价 Choleve™ (Choleve™ 表示从实施例 2 获得的产品，

组失访 11 例，自行终止试验 1 例，违背方案 2 例；经过 12 周的临床实验，服用 Choleve™ 4 周、12 周后，血 LDL-C 水平从 4.08mmol/L 降低至 3.68mmol/L 和 3.40mmol/L，分别显著下降了 9.6% 和 16.4% (P 值均等于 0.0001)；而安慰剂组血 LDL-C 水平几乎无改变，血 LDL-C 水平的变化百分数仅为 1.8% 和 0.26%。服用 Choleve™ 4 周、12 周后，血 TC 水平的改变尽管不及 LDL-C 水平，但仍分别下降了 6.7% 和 11.3% (P 值均等于 0.0001)。(具体结果见表 3、表 4)。而且服用 Choleve™ 后，血 LDL-C 水平和 TC 水平的下降幅度 12 周大于 4 周。服用 Choleve™ 对血 TG 和 HDL 水平无明显影响。

表 3 服药 4 周和 12 周后，受试者的血脂谱¹分析 (单位 mmol/L)

	0 weeks		4 weeks		12 weeks	
	Choleve™ (n=114)	Placebo (n=109)	Choleve™ (n=114)	Placebo (n=109)	Choleve™ (n=114)	Placebo (n=106)
TC	6.31±0.58	6.18±0.64	5.87±0.68 ^{2,3}	6.18±0.80	5.58±0.70 ^{2,3}	6.12±0.64
LDL-c	4.08±0.42	4.00±0.46	3.68±0.55 ^{2,3}	4.06±0.65	3.40±0.56 ^{2,3}	4.00±0.55
HDL-c ⁴	1.43±0.32	1.45±0.36	1.40±0.32	1.42±0.35	1.42±0.29	1.41±0.32
TG ⁵	2.10±0.86	1.93±0.82	2.08±0.97	2.00±0.82	2.07±1.02	1.90±0.79

¹ $\bar{x} \pm SD$

² P=0.0001 与 0 周基线比较

³ P=0.0001 与 0 周基线比较，并将基线值作为协变量，进行协方差分析的结果

^{4,5} 服药组与安慰剂组之间无显著性差异

表 4 服药 4 周和 12 周后，受试者的血脂下降百分率¹ $\bar{x} \pm SE$

	4 weeks		12 weeks	
	Choleve™ (n=114)	Placebo (n=109)	Choleve™ (n=114)	Placebo (n=106)
TC(%) ²	-6.70±0.84	0.05±0.87	-11.34±0.89	-0.72±0.77
LDL-c (%) ³	-9.58±1.09	1.75±1.29	-16.4±1.10	0.26±1.24
HDL-c (%) ⁴	0.35±2.10	-0.36±1.65	2.30±2.06	-0.69±1.59
TG (%) ⁵	0.51±2.58	11.79±4.82	2.58±3.52	5.58±3.76

¹ $\bar{x} \pm SEM$

^{2, 3} P=0.0001 与 0 周基线比较

^{4, 5} 服药组与安慰剂组之间无显著性差异

表 5 的结果表明，服用 Choleve™ 对 1 分钟和最大血小板聚集率无明显影响。

表 5 经过 12 周服药后受试者血小板聚集率 $PLAG(\bar{x} \pm SD)$ 的情况

	0 weeks		12 weeks	
	Choleve™ (n=114)	Placebo (n=106)	Choleve™ (n=114)	Placebo (n=106)
PLAG%(1min)	40.2±16.1	37.5±14.0	36.8±15.6	40.3±16.1
PLAG%(Tmax)	56.2±20.6	57.3±19.1	56.5±23.0	57.4±19.1

结论

研究结果表明：茶黄素具有显著降低血 LDL-C 的作用，4 周、12 周 LDL-C 水平与基线以及安慰剂比较降低幅度分别为 9.6%、16.4% 以及分别为 11.33%、16.66% (P 值均为 0.0001)，而且研究期间临床入选病例的血常规、肝、肾功能、血糖、血电解质均无异常，亦无与用药相关的腹胀、腹痛、恶心等不良事件，这些结果表明，茶黄素具有高度的耐受性和安全性。这是任一化学合成药物不能比拟的，也是调脂药物所追求的第一目标。而且如果增加 Choleve™ 的每天摄入量（从安全性而言是可行的），使 LDL-C 下降 20% 以上是完全可能的。一般认为，LDL-C 水平下降 20% 以上对冠心病一级预防、二级预防就可取得显著的临床效益，特别是对于轻、中度危险的冠心病一级预防、二级预防而言，其临床意义更大，可为预防和/或治疗高脂血症与其相关的其它心血管疾病的健康产品。